

ST/EP 97 / 069 07
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

09/319678



REC'D	10 FEB 1998
WIPO	PCT

Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT

Die HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT in Frankfurt am Main/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Neue funktionelle supramolekulare Nanosysteme"

am 11. Dezember 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 H und C 07 B der Internationalen Patentklassifika-
tion erhalten.

München, den 29. September 1997
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Akt. München: 196 51 560.2

faust

Beschreibung

Neue funktionelle supramolekulare Nanosysteme

Die vorliegende Erfindung betrifft funktionelle supramolekulare Nanosysteme, und im besonderen solche, die mittels nichthelikal-linearen, selektiv paarenden Systemen konstituiert werden, und insbesondere ein System von nanostrukturierten Materialien, die Untereinheiten zur gezielten Herstellung eines solchen Systems, sowie ihre Herstellung durch Selbstorganisation (chemische und nanochemische Synthese).

Die Miniaturisierung von technischen Bauelementen dringt in den Bereich molekularer Größenordnungen vor. Die aus Chemie und Physik bekannten Eigenschaften von Molekülen bestimmen die Grenzen für herkömmliche Verfahren wie etwa der photochemischen Behandlung eines Chip-Wafers zum Aufbau einer integrierten elektronischen Schaltung, da man dem Bereich der diskreten molekularen oder atomar-quantisierten Materialeigenschaften nahekommt. Gerade diese diskreten molekularen Eigenschaften werden in der supramolekularen Chemie genutzt, um gezielt synthetisierte Einzelmoleküle zu funktionellen Ensembles zusammenzutreten zu lassen, die neuartige, gewünschte Materialeigenschaften haben können. Wie in einem Baukasten zeichnen sich die einzelnen Bauteile durch

- (1, 2) Stabilität und Selektivität der "Verknüpfung" zur Selbstorganisation,
- (3) kontrollierbarer Topizität und, - wie im folgenden deutlich werden wird - durch eine dynamische Beeinflussung der Aggregation bzw. Selbstorganisation, die wir
- (4) kontrollierte molekulare Kinematik nennen.

Materialeigenschaften, die erfolgreich durch Nanostrukturierung hervorgerufen oder beeinflusst werden, sind vor allem die
(I, II) optischen und chiroptischen Eigenschaften (Beispiele: Kerr-Zellen und

LEP-Technik),

- (III) elektrischen Eigenschaften (Halbleiter oder Leiter durch Konstitution von Leitungsbändern, Defektelektronen, Farbzentren, Bereichen mit modulierbaren unelastischen Strömen)
- (IV) chemisch, katalytischen Eigenschaften (Zeolithe, Metall-Cluster-Katalyse, Konstitution von Reaktionsräumen Lit Menger) sowie
- (V) physikalische Oberflächen- und Transporteigenschaften wie Durchlässigkeit Adhäsion und Kompatibilität mit anderen Werkstoffen oder empfindlichen biologischen Systemen (Biokompatibilität).

Nanosysteme, die Teilbereiche mit solchen Eigenschaften kooperativ nutzen, können als "molekulare Maschinen", bzw funktionelle "molekulare Schaltungen" angesehen werden.

Das Problem bestand nun darin, ein System zu erfinden, das die Vorteile (1) bis (4) auf sich vereinigt, um die Herstellung einer Vielzahl von nanostrukturierten Systemen zu ermöglichen, die die Eigenschaften (II)-(V) mittelbar (durch anschließende Fixierung chemischer oder physikalischer Art) oder unmittelbar (z. B. im direkten Screening der katalytischen Aktivität) zugänglich machen.

Erste Versuche zur Bildung solcher Systeme wurden kürzlich beschrieben (R. L. Letsinger, et al., Nature 1996, 382, 607-9, sowie "Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA"; P. G. Schultz et al., Nature 1996, 382, 609-11). Die Paarungseigenschaften (Stabilität und Selektivität) von natürlicher DNA wurde genutzt, kovalent an DNA-Stränge komplementärer Basensequenz gebundene Metallcluster zu Gruppen zusammenzutreten zu lassen, um so Cluster-Verbände mit potentiell neuen Material-Eigenschaften zu bilden.

Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung

1.) funktionelle supramolekulare Nanosysteme, die mittels nichtheilkal-linearen, selektiv paarenden Systemen konstituiert werden;

2.) funktionelle supramolekulare Nanosysteme, bevorzugt konstituiert mittels paarenden Pyranosyl-RNA-Untereinheiten, ihren Rückgratmodifikationen bevorzugt als Thiophosphat, alkyliertes Phosphat, Phosphonat oder Amid mit konformativen Einschränkungen entsprechend der Pyranosyl-RNA, sowohl analoger linearer Paarungssysteme, deren Basenpaar durch zwei am Metallzentrum koordinierte Liganden ersetzt ist.

3.) Systeme wie unter 1.) und 2.) beschrieben, welche sich dadurch auszeichnen, daß sie aus kovalenten Pyranosyl-RNA-Liganden bevorzugt mit Metallclustern, ganz besonders bevorzugt mit Peptiden, ganz besonders bevorzugt mit Redox-Zentren ganz besonders auch mit Fluoro- oder Chromophoren oder Metallliganden bestehen.

4.) Die vorliegende Erfindung betrifft ferner kombinatorisch aufgebaute Nanobibliotheken aus Systemen gemäß 1.), 2.) oder 3.), die zum Zwecke des Eigenschaftsscreenings (bevorzugt I-IV) konstituiert wurden, indem ein Templatstrang statistisch bzw. nach kombinatorischen Dekonvolutionstechniken als Subbibliothek die in Lösung vorhandenen komplementären Ligate zum Nano-System paarnd zusammenführt.

5.) Nanosystem bestehend aus Systemen gemäß 1.) bis 4.), das durch die Veränderung der Gleichgewichtsbedingungen wie bevorzugt Druck, Temperatur, Veränderung der Konzentration bzw. anderer Gleichgewichtsbedingungen (Ionenkonzentration, pH, Temperatur, Druck) von Komplementären Oligomeren Paarungsgrad und Paarungsart ändert um strukturelle Veränderungen makroskopisch induzierbar zu machen.

6. Nanosysteme bestehend aus Systemen gemäß 1.) bis 5.), dadurch gekennzeichnet, daß sie nach der Selbstorganisation, fixiert werden, bevorzugt durch chemische Fixierung (kovalente Vernetzung, Metathese, Heckkupplung, Michaeladdition von Thiole oder oxidativer Bildung von Disulfidbrückenbildung), ganz bevorzugt durch Aufziehen auf feste Phase (Wafer oder Träger).

Im folgenden wird die vorliegende Erfindung im Detail beschrieben.

1. p-RNA-codierte Metallcluster

Als natürliches Modell dient die Codierung von Aminosäuren für die Proteinsynthese (Fig. 1) durch jeweils ein Basentriplett (Anticodon) dienen. Analog werden beispielsweise Metallcluster durch Anbindung an die terminale Base eines Oligomer-p-RNA-Einzelstrangs, bevorzugt Tetra- bis Octamer, codiert (Fig. 2.). Mit höherem Cytosin- und Guanosin-Anteil könnten aufgrund der höheren Bindungsenthalpie dieses Paares kürzere Oligos verwendet werden.

Dann wird ein oligomerer Mutterstrang, bevorzugt aus 10 bis 100 Monomereinheiten, mit frei wählbarem, der gewünschten Clusterabfolge entsprechende Code am Synthesizer hergestellt, mit den komplementär codierten Metallclustern vereint und durch Erwärmen äquilibriert. Zum Beispiel durch Abkühlung der Lösung (Duplexbildung durch Hybridisierung) erhielt man ein Clusterband, das auf seine homogen katalytischen Eigenschaften in Wasser, z. B. zur VAM-Katalyse, hin untersucht wird.

Vorteilhaft wird diese Katalysatorsuche durch das Screening einer kombinatorisch erstellten Clusterbibliothek durchgeführt: Dazu wird der Mutterstrang kombinatorisch synthetisiert und dann die Hybridisierung durchgeführt. Damit erhält man eine Clusterbibliothek, deren Diversität direkt mit jener des codierenden Mutterstrangs korreliert; bevorzugt werden

hier Sub-Bibliothek-Routinen angewendet, die eine einfache Identifizierung der aktiven Species erlauben (wie z. B. Positional Scanning oder Orthogonal Libraries).

Das beschriebene Verfahren ist nicht auf die Anwendung auf Metallcluster beschränkt, sondern läßt sich auch auf beliebige andere Entitäten, wie Monomerbausteine, Chromophore Substanzbibliotheken aber auch den Aufbau katalytischer Kaskaden durch Anknüpfung katalytischer Zentren anwenden.

Mit dieser Methode ist es aber auch denkbar, unterschiedliche Metallcluster im Hinblick auf den Aufbau von elektronischen Schaltmustern auf der supramolekularen Ebene räumlich zu positionieren (correlated single-electron tunneling wird als zukünftige Basis von nanoelektronischen digitalen Schaltungen angesehen, s. H. Grabert, M. H. Devoret, Eds., Single-Charge Tunneling, Plenum, New York, 1992, sowie C. P. Kubiak, Science 1996, 272, 1323-5).

Dabei könnte das Schaltmuster direkt am Oligonucleotidsynthesizer generiert werden. Der Aufbau von Cluster-Gittern mit stäbchenförmigen Dithiolen wurde bereits beschrieben (R. P. Andres et al., Science 1996, 273, 1690-3); diese weisen auch gute Stabilität auf (D. J. Schiffrin et al, Adv. Mat. 1995, 7, 795-7).

2. p-RNA-chelatisierte Metalle

Dabei wird das Basenpaar durch einen Einzentrenkomplex ersetzt, wofür auch die Synthese von homochiralen, aber enantiomeren p-RNA-Strängen notwendig ist (Fig. 3.). Dadurch erhält man einen kontrollierten Zugang zu linearen, nichtheikalen, oligomeren Metallkomplexen. Durch die sprossenartige Anordnung in einer Ebene kann der Paarungsvorgang optimal auf die Größe von unterschiedlichen Metallzentren reagieren - es läßt

transversale Aufweitung prinzipiell beliebiger Weite zu - was bei helicalen Systemen nicht möglich ist (Fig. 3.).

Analog zum Paarungssystem der Pyranosyl-RNA ergibt eine Duplexbildung aus oligomeren Liganden über die Metall-Ligandierung eine geneigte, jedoch nichtheikale, repetitive Struktur, die je nach Wahl des Liganden spezifische Metallzentren koordiniert und entlang der Duplex-Achse Metall-Metall-Wechselwirkungen oder gewünschte Fehlstellen ermöglicht.

Die mit solchen Liganden kontrolliert herstellbaren Metall-Sequenzen stellen einen neuen Nano-Legierungssatz zur Herstellung von „nano-wires“ dar. Auch in nichtwässrigem Milieu lösliche Oligomerliganden, deren idealisierte Rückgratkonformation wie die p-RNA durch einen ebenen Diamantgitterausschnitt beschreibbar sind, können synthetisiert werden.

Pyranosyl-RNA

Das selektivste und stabilste bisher bekannte Paarungssystem ist die von A. Eschenmoser erfundene pyranosyl RNA (Pyranosyl-RNA ('p-RNA'): Base-Pairing Selectivity and Potential to Replicate S. Pitsch, R. Krishnamurthy, M. Bolli, S. Wendeborn, A. Holzner, M. Minton, C. Lesueur, I. Schlönvogt, B. Jaun, A. Eschenmoser Helv. Chim. Acta 78 1621-35). Das völlige Fehlen der Hoogsteen-Paarung in diesem System und die Unmöglichkeit der parallelen Stranganordnung bei homochiralen Rückgrat (d. h. alle Ribosebausteine besitzen die gleiche Chiralität) hebt den Vorzug der p-RNA gegenüber den beschriebenen immer helicalen und sehr fehlerhaft paarenden DNA-Systemen hervor. In allen natürlichen Paarungssystemen muß man sich alle Reste oder ans Paarungssystem angeknüpfte Komponenten auf einen Zylinder angeordnet vorstellen. Somit tritt topologisch der DNA-Strang zwangsläufig zwischen viele Reste, die somit physikalisch voneinander getrennt sind.

Die Entdeckung der reversen Watson-Crick-Basenpaarung in Pyranosyl-RNA-Duplexen mit Rückgratsträngen aus Ribose mit entgegengesetzter Chiralität bewies ein System, das erstmals aus grundsätzlichen Erwägungen streng planar lineare Duplex-Stränge konstituiert (Pyranosyl-RNA: Paarung zwischen homochiralen Oligonucleotidsträngen entgegengesetzten Chiralitätssinns R. Krishnamurthy, S. Pitsch, M. Minton, C. Miculka, N. Windhab, A. Eschenmoser, Angew. Chem. 108, 1619-23). Alle Reste, die in gleicher Weise an den Pyranosyl-RNA-Strang gebunden sind, befinden sich auf der gleichen Seite der Duplex.

Es ist nun gelungen, durch literaturbekannte Linkerchemie (R. L. Letsinger, et al., Nature 1996, 382, 607-9, sowie „Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA": P. G. Schultz et al., Nature 1996, 382, 609-11, 399 Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent Science, 776-779, 30; Chemical Ligation Approach To Form a Peptide Bond between Unprotected Peptide Segments. Concepts and Model Study C.-F. Liu, J. P. Tam, J. Am. Chem. Soc., 116 4149-53; sowie käufliche Basen- und Amidit-Linkerstrategien; Synthesis of Oligoarginine-Oligonucleotide Conjugates and Oligoarginine-Bridged Oligonucleotide Pairs, Z. Wei, C.-H. Tung, T. Zhu, S. Stein, Bioconjugate Chem., 5, 468-74; Peptide segment ligation strategy without use of protecting group C.-F. Liu, J. P. Tam Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 6584-8) unterschiedlichste Substanzen als Pyranosyl-RNA-Ligate zu Pyranosyl-Nanostrukturen unter thermodynamischer Paarungskontrolle zusammenzuführen. Substanzklassen zur Bildung dieser Ligate sind beispielsweise Peptide, Metallcluster, Redox-Zentren wie Chinone oder Metall-Liganden-Komplexe, Chromophore und Fluorophore, Leitende Oligomere wie konjugierte Alkin-Alken-Aromat-Reste.

Durch die Änderung der Gleichgewichtsbedingungen konnten verschiedene Bereiche so zum paaren bzw. entpaaren gebracht werden, daß reversibel zunächst entfernte Molekülreste in unmittelbare Nähe gebracht werden

konnten: Nano-Transport.

Die Variationen zum gezielten und reproduzierbaren Aufbau unterschiedlichster Metallcluster-Sequenzen, reaktiver Push-Pull-Bereiche und der molekularen Maschine, die Reaktionszentren sich bilden und makroskopisch gesteuert wieder umwandeln läßt, sind bei diesem synthetischen Nano-System nicht erschöpfend beschreibbar. Das pyranosyl System bietet die Qualitäten 1-4 in bisher nicht erreichtem Maß.

Figur 3 zeigt ein völlig neuartige, hier angewandte Methode Pyranosyl-Untereinheiten zur duplexieren. Das Basenpaar der Pyranosyl-RNA weicht einem Ligandenpaar, das an Stelle der Wasserstoffbrücke ein Metallzentrum quadratisch planar koordiniert. Solche Untereinheiten haben typischerweise Halbleitereigenschaften (für helikale Systeme beschrieben in Jean Marie Lehn, Supramolecular Chemistry, Verlag VCH, Weinheim, 1995) : Selbstaggregation mit Nano-Wire-Eigenschaften.

Beispiele

1. Templatkontrollierte Reihung an Pyranosyl-RNA (Fig. 2)

Goldcluster wurden, wie in den beschriebenen Verfahren (R. L. Letsinger, et al., Nature 1996, 382, 607-9, sowie „Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA": P. G. Schultz et al., Nature 1996, 382, 609-11) diesmal an Pyranosyl-Untereinheiten kovalent gebunden (Monomeren- und Phosphamiditsynthese, wie in der Originalliteratur beschrieben Linkerchemie siehe am angegebenen Ort). Tempern und Abkühlen auf 0 °C ließ die komplementären Strangfragmente in Standard-Pufferlösungen (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7) an einem langen Templatstrang paaren, Beweis der Konstitution einer kontrollierten Clustersequenz durch UV- und CD-Spektroskopie. Natürliches Vorbild: Antikodon-Wechselwirkung.

Die so hergestellten Nano-Cluster-Ensembles wurden im Vakuum auf Silikagel-Träger aufgezogen und so dem Screening auf katalytische Aktivität zugeführt.

2. Molekulare Nano-Kinematik (Fig 4)

Mit Hilfe der Phosphoramiditmethode wurde ein teilweise als Hairpin selbstkomplementärer Pyranosyl-RNA-Strang mit 4' und 5'-Linkerenden der Sequenz Linker-*rp*-GCCA₅CGC-Linker synthetisiert und an die Linkerenden wie in der Literatur beschrieben mit Maleimido-Goldclustern verknüpft. Anschließend wurde im Standardpuffer (0,15 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7) die Paarung zum Hairpin mit 10 mM-Ligatkonzentration spektroskopisch nachgewiesen. Zugabe eines äquivalents des Komplementärstranges *rp*-G(T₅)C bewies durch spektroskopischen Nachweis des A-T-Paares die Öffnung des Hairpins und das Auseinandertreten der Goldcluster. Einfaches Verdünnung der ganzen Lösung ließ wieder die Hairpin-Geometrie einstellen (Doppelstrangdissoziation durch Verdünnung). Durch Zugabe eines komplementären Fragments wurde also die Hairpinstruktur thermodynamisch verdrängt, die Clusterbereiche treten auseinander, durch Verdünnung würde die alte Struktur "geschaltet". Es ist somit prinzipiell gezeigt, wie man makroskopisch gesteuert mit Hilfe der "Nano-Maschine" ein Substrat nacheinander unterschiedlichen (Reaktions-) Zentren aussetzt.

Patentansprüche

1. Funktionelles supramolekulares Nanosystem, dadurch gekennzeichnet, daß es mittels nichthelikal-linearen, selektiv paarenden Systemen konstituiert wird.
2. Funktionelle supramolekulares Nanosystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es mittels paarenden Pyranosyl-RNA-Untereinheiten konstituiert wird.
3. Funktionelles supramolekulares Nanosystem nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Rückgratmodifikationen der Pyranosyl-RNA-Untereinheiten als Thiophosphat, alkyliertes Phosphat, Phosphonat oder Amid ausgebildet sind.
4. Funktionelles supramolekulares Nanosystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Basen durch zwei am Metallzentrum koordinierte Liganden ersetzt sind.
5. Funktionelles supramolekulares Nanosystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus kovalenten Pyranosyl-RNA-Ligaten mit Metallclustern bestehen.
6. Funktionelles supramolekulares Nanosystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus kovalenten Pyranosyl-RNA-Ligaten mit Peptiden bestehen.
7. Funktionelles supramolekulares Nanosystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus kovalenten Pyranosyl-RNA-Ligaten mit Redox-Zentren bestehen.

8. Funktionelles supramolekulares Nanosystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus kovalenten Pyranosyl-RNA-Ligaten mit mit Fluoro- oder Chromophoren bestehen.

9. Funktionelles supramolekulares Nanosystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus kovalenten Pyranosyl-RNA-Ligaten mit Metallliganden bestehen.

10. Kombinatorisch aufgebaute Nanobibliotheken bestehend aus wenigstens einem funktionellen supramolekularen Nanosystem gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, wobei ein Templatstrang statistisch bzw. nach kombinatorischen Dekonvolutionstechniken als Subbibliothek die in Lösung vorhandenen komplementären Ligate zum Nano-System paarnd zusammenführt.

11. Verwendung eines funktionellen supramolekularen Nanosystems, das durch die Veränderung der Gleichgewichtsbedingungen wie bevorzugt Druck, Temperatur, Veränderung der Konzentration bzw. anderer Gleichgewichtsbedingungen (Ionenkonzentration, pH, Temperatur, Druck) von Komplementären Oligomeren Paarungsgrad und Paarungsart ändert, um strukturelle Veränderungen makroskopisch induzierbar zu machen.

12. Funktionelles supramolekulares Nanosystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach der Selbstorganisation, fixiert werden, bevorzugt durch chemische Fixierung ganz bevorzugt durch Aufziehen auf feste Phase.

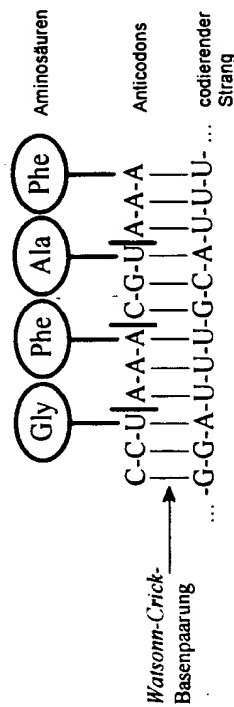


Fig. 1: Natürliche Basenpaarung bei der Peptidsynthese

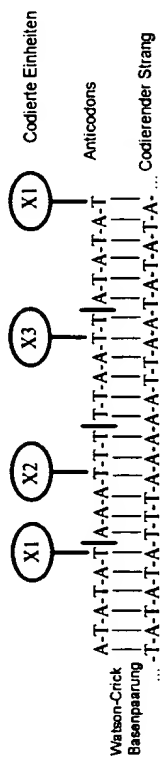


Fig. 2:

Codierte Einheiten X1, X2, X3, usw. (z.B. Metall-Cluster, Chromophore, Metalle, Metallionen)

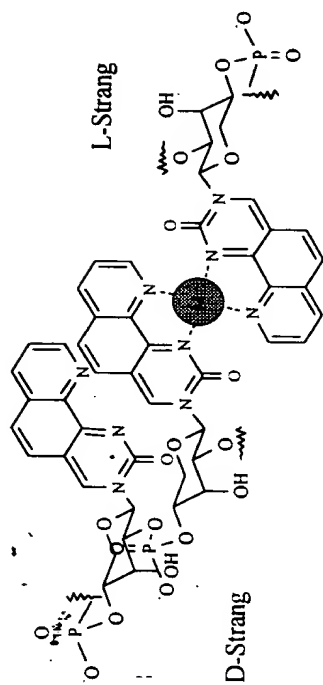


Fig. 3

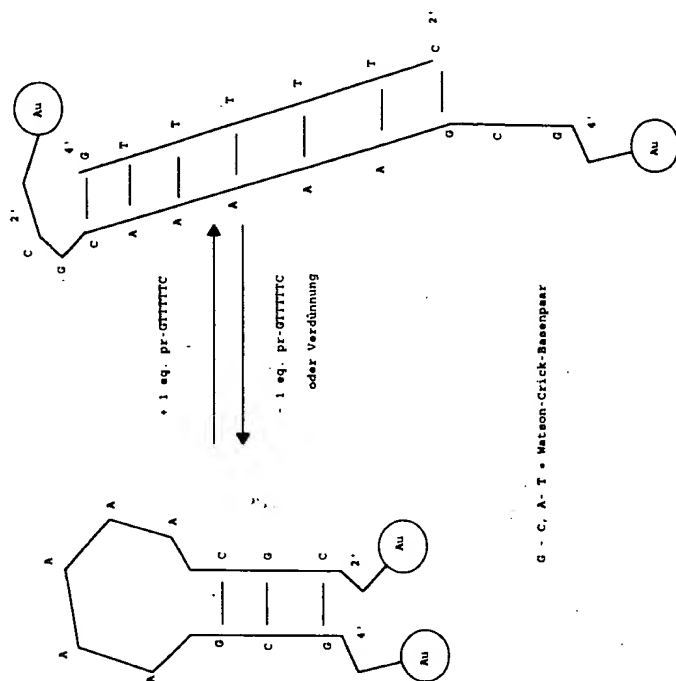


Fig. 4